

中國醫藥大學
臨床醫學研究所
碩士學位論文

正常妊娠及子癩前症孕婦胎盤組織中
滋養層細胞其凋亡與增殖表現的研究

The Expression of Apoptosis and Proliferation
in the Placental Trophoblast Between
Normal and Preeclampsia Women

指導教授：許朝添 教授

研究生：魏添勇

中華民國九十七年六月

中文摘要

前言

子癩前症(preeclampsia)是一種在妊娠 20 週以後發生高血壓，蛋白尿及水腫的疾病，發生率約 7%到 10%，它是造成胎兒罹病及流產死亡最常見原因，及懷孕母親死亡的第二常見因素，它的確實病理機轉目前仍完全明白，而胎盤就是一個重要因素，一般相信胎盤中的絨毛(villus)異常與此疾病有密切關連，隨著懷孕週數增加，絨毛會增殖(proliferation)、移行(migration)及深入(invasion)子宮，形成胎兒與母親的養份交流站，因此絨毛上的滋養層細胞(trophoblastic cells)絕對是一個重要關鍵。胎盤中的滋養層細胞凋亡(apoptosis)與增殖與子癩前症是否有關，目前研究的資料仍不多，本篇研究主要目的在比較子癩前症與正常懷孕胎盤，其滋養層細胞凋亡及增殖的表現是否有所不同，以期更了解及解釋子癩前症的病理機轉。

研究材料與方法

胎盤組織是從 7 位正常足月妊娠與 7 位子癩前症取出，她們皆是接受剖腹生產，且在產程陣痛之前就生產，細胞凋亡的研究是利用 TUNEL 方法，在評估細胞增殖的方法是利用免疫組織化學染色法，測出 Ki-67、 Bcl-2, BMP family (bone morphogenetic protein)、 CD34、 VEGF(vascular endothelial growth

factor) & VEGF receptor-I 在滋養層細胞的免疫組織化學表現。結果評估方式則是利用下列兩項：一為 positive index rate(%) 代表染色有陽性反應者占所有細胞的比例。二為 semiquantitative immunohistochemical Remmele score(IRS)。皆利用光學顯微鏡來做為計數工具，獲得平均值 \pm 標準差。比較子癩前症與正常者胎盤滋養層細胞在凋亡與增殖表現的不同。

研究結果

在子癩前症胎盤滋養層細胞發生細胞凋亡的平均值是 $0.37 \pm 0.04\%$ ，高於正常胎盤是 $0.18 \pm 0.05\%$ 。Ki-67 的表現在子癩前症滋養層細胞發生的平均值是 $4.60 \pm 0.20\%$ ，高於正常胎盤 $3.96 \pm 0.39\%$ ；細胞凋亡與 Ki-67 的表現在子癩前症病人較正常者來的顯著明顯。而 Bcl-2 的 IRS 在子癩前症與正常者分別是 3.70 ± 0.86 和 4.03 ± 1.25 ，子癩前症雖較正常者低，但統計學上無明顯意義。VEGF 在子癩前症胎盤裡陽性比例平均值 7.02 ± 1.15 ，而正常者為 6.68 ± 0.73 ，雖然子癩前症滋養層細胞質內 VEGF 蛋白表現較正常者較高，但統計學上也無明顯差異，其他標誌例如 CD34、BMP protein family、VEGF receptor 則兩者相同表現。

結論

子癩前症胎盤的滋養層細胞 Apoptosis 及 Ki-67 的表現皆比正常者明顯增加，其原因可能和 anti-apoptotic factor(Bcl-2 protein) 表現減少，或是因為胎盤絨毛血管內膜細胞功能異常造成組織缺氧，另一方面 up-regulation proliferation 的表現(例如 VEGF、Ki-67)；可見這些因子的表現在子癩前症的病理機轉上扮演著一定角色。

中文關鍵字：子癩前症;滋養層細胞;細胞凋亡;增殖



Abstract

Background

Preeclampsia is characterized by hypertension, edema, and proteinuria and affects 7-10% of all pregnancies. It is a major cause of maternal and fetal morbidity and mortality, but its etiology remains unknown. The human placenta is a tumorlike organ in which proliferation, migration, and invasion of extravillous trophoblastic cells take place. Trophoblastic cells migrate and invade the uterus and its vasculature to provide a vital link between the mother and the developing fetus. Trophoblastic cell play an important role in maintenance of placental function. Little information, however, is available on the roles of apoptosis and proliferation in the trophoblast of placenta in relation to the pathophysiology of preeclampsia.

Objectives

The aim of the study was to compare the difference between preeclampsia and normal term pregnancy placenta in the expression of some proliferation and apoptotic/anti-apoptotic markers in the human placenta.

Materials and Methods

Placental samples were obtained from 7 normal uncomplicated term pregnancy and 7 preeclampsia patients. Placenta samples were collected during cesarean section. None of the patients were in labor. After extraction of the newborn, placental insertion was verified and the placenta was rapidly delivered. Placenta villi were corrected in the center part of the placenta avoiding infarcted areas. Apoptosis was assessed by the terminal deoxynucleotidyl transferase deoxy-UTP-nick end labeling (TUNEL) method. Expression of Ki-67, Bcl-2, BMP family (bone morphogenetic protein), CD 34, VEGF (vascular endothelial growth factor) & VEGF receptor-II were assessed using immunohistochemistry. Light microscopy was used to quantify its incidence. The positive index rate (%) was defined as (positive stain cells/ total nuclei) X 100 and expressed as mean \pm SD. The Bcl-2 and VEGF expression were assessed by semiquantitative Immunohistochemical Remmele Score (IRS). For each placenta, 5 randomized fields are examined by light microscopy at a magnification of x 200 (x 20 objective lens and x 10 eyepiece). Statistical significance was determined by using analysis of variance to compare the rates between normal and preeclampsia placentas. Statistical significance was considered to be present at $P < 0.05$. (Mann Whitney *U* test).

Result

The TUNEL-positive cells of the placenta were trophoblast with cluster of nuclei and the TUNEL-positive index of these cells was $0.37\% \pm 0.04\%$ and normal placenta was $0.18\% \pm 0.05\%$. The Ki-67-positive index cells was $4.6\% \pm 0.2\%$ and normal placenta was $3.9\% \pm 0.3\%$. The incidence of apoptosis and Ki-67 expression were significantly higher in preeclampsia placentas compared with normal. In contrast the Bcl-2 expression was lower in preeclampsia than normal, although no significant difference. And VEGF protein was higher in preeclampsia than normal, although still no significant difference. The other expression markers (ex. CD34 , BMP protein family, VEGF receptor) were no statistical significance difference between preeclampsia and normal placentas.

Conclusion

These results suggest that trophoblast proliferation and apoptosis may play a role in the pathophysiologic mechanisms of preeclampsia.

Key words: preeclampsia ; trophoblast ; apoptosis ; proliferation

誌謝詞

自從醫學系畢業後一直在從事臨床工作，對於基礎研究總覺得有些陌生，基於為了讓自己能更深入在研究，報名了基礎醫學研究所臨床組，但剛通過入學考試後只高興幾分鐘而已，原因在於對於本校並非很熟悉，因為光是尋找指導老師就困擾著我，還好最後找到病理科許教授，感謝老師在這段時間內的幫忙與指導，尤其是在臨床工作忙碌下，醫院與學校兩邊跑，對我的壓力實在不小，了解到臨床醫師要從事基礎研究真的不是一件容易的事，所幸在許老師的包容與體諒及其他病理科同仁(例如：瑞辰及正守)的協助下，使得研究工作可以如期完成。

學生 魏添勇



目錄

	頁碼
中文摘要	I
英文摘要	IV
目錄	VIII
附表目錄	X
附圖目錄	XI
第一章 論文正文前言	1
第一節 研究背景	2
子癲前症	2
胎盤的凋亡與增殖	2
TUNEL	5
Ki-67 表現	5
骨誘導蛋白	6
CD34	7
血管內皮生長因子	7
第二節 研究目的	8

第二章	研究方法	8
第一節	研究材料	9
第二節	研究設計	11
第三節	統計方法	14
第三章	研究結果	15
第四章	討論	18
第一節	結果討論	18
第二節	研究限制	20
第五章	結論與建議	21
第一節	結論	21
第二節	建議	21
參考文獻		37
附錄		41



	附表目錄	頁碼
表一：	子癩前症輕度與重度臨床分類	22
表二：	實驗設計流程	23
表三：	14 位孕婦的臨床資料	24
表四：	子癩前症病人和正常者孕婦臨床資料的比較	25
表五：	子癩前症滋養層細胞內細胞凋亡統計與正常比較	26
表六：	子癩前症滋養層細胞內細胞 Ki-67 的表現與正常者比較	26
表七：	BMP family 的免疫組織化學染色統計	27



附圖目錄

頁碼

圖一：	胎盤滋養層細胞經 TUNEL 染色	28
圖二：	Bcl-2 蛋白在胎盤滋養層細胞的細胞質經免疫組織化學染色	29
圖三：	子癩前症胎盤滋養層細胞 IRS 與正常者的比較	30
圖四：	Ki-67 在胎盤滋養層細胞內經免疫組織化學染色法	31
圖五：	VEGF 在胎盤絨毛上的免疫組織化學染色	32
圖六：	VEGF 在子癩前症胎盤滋養層細胞 IRS 與正常者的比較	33
圖七：	VEGF receptor I 在胎盤絨毛上的免疫組織化學染色	34
圖八：	BMP receptor 在胎盤絨毛上的免疫組織化學染色	35
圖九：	CD34 在胎盤絨毛上的免疫組織化學染色	36

第一章 前言

在美國約有 7 到 10% 懷孕的婦女有子癩前症(Preeclampsia)¹，它是造成胎兒罹病及流產死亡最常見原因，及懷孕母親死亡的第二常見因素²；它的發生和母親年齡並無特別相關，但卻更容易發生在第一胎的母親，及有不同性伴侶的多胞胎婦女，這或許因為接觸到不同性伴侶的特別抗原(specific antigen)有關。子癩前症確實發生的病理機轉目前尚未完全明瞭，而終止妊娠將胎盤移除母體，母體血壓便急速恢復正常。可見胎盤是否正常和子癩前症的發生有著密切關係。

許多因素或許可能有關，例如血管收縮的發生(the onset of vasospasm), 凝血系統的活化(activation of the coagulation system), 氧化壓力(oxidative stressors), 增加發炎反應(increased inflammatory response), 血管內膜細胞功能失調(endothelial cell dysfunction)、缺血(ischemia)³。一般相信胎盤中的滋養層細胞(trophoblast)的異常與此疾病有密切關連，當受精卵著床至子宮內膜，隨著胎盤的發育，滋養層細胞會侵入子宮內膜，形成 saclike, flaccid vessels，若在侵入形成過程中有異常，例如血管壁過厚，通透性異常則可能造成懷孕中後期血壓增高。

第一節 研究背景

1. 子癲前症

這是一種只發生在人類身上的病⁴，定義為本來正常無高血壓的婦女，在懷孕 20 週以後，血管收縮壓超過 140 mmHg 且舒張壓超過 90 mmHg，且需連續兩次間隔 4 小時以上皆不正常，同時 24 小時尿液中的蛋白超過 300 mg 或尿液試紙蛋白尿超過 1+⁵，根據嚴重程度又分為輕度及重度(如表一)。子癲前症是造成胎兒與孕婦致命的最主要妊娠疾病，它是一種多發性器官的異常造成，從單純懷孕 20 週後血壓增高，腎臟腎絲球過濾異常尿蛋白質流失，到血液溶血(hemolysis)，肝功能異常(elevated liver function)，低血小板症狀(合稱 HELLP syndrome)，甚至癲癇發生。目前對於它的病理致病機轉仍未完全了解，但是內膜上皮細胞功能異常(endothelial cell dysfunction)⁶則絕對是一個關鍵因素。

2. 胎盤的凋亡及增殖

細胞凋亡，其實就是細胞死亡，但不同於一般細胞因為受傷或是受到一些因子攻擊而死亡，細胞凋亡指的是細胞自己計劃性的死亡，就像是細胞的自殺一樣。細胞凋亡的機制可大略分為兩種，一種是細胞上的死亡接受體接受到死亡分子 (death molecules) 導致的 (death receptor-

mediated events) , 而另一種是由細胞內的粒腺體接受到死亡訊號 (death signals) 而導致 (mitochondria-mediated events) 。

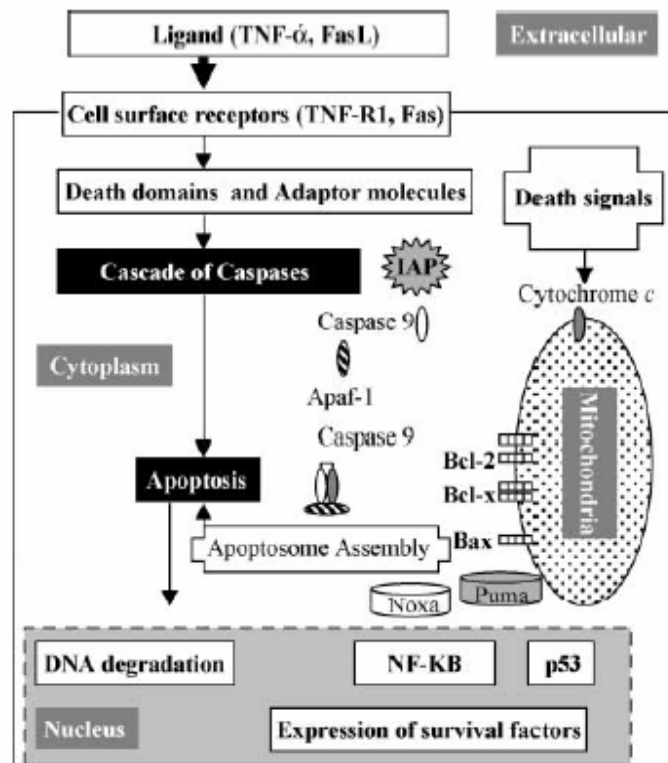


圖 細胞凋亡機制 上圖是兩種導致細胞凋亡機制的示意圖，一種是由細胞上受器與細胞外的 death molecules (TNF/ FasL) 結合所觸發，此為 death receptor-mediated events ，而另一種為粒腺體接收到細胞內的 death signals 而引發細胞凋亡。

1972 年 Kerr ⁷ 等提出細胞凋亡的概念，細胞凋亡又稱謂細胞程序化死亡(programmed cell death) ，透過這種基因調控機制，身體完成衰老與畸形細胞的清除。胎盤是一個很特別的器官，一般未懷孕的人類是不會有這器官，它提供母親與胎兒營養與血液在此交流但卻不直接接觸，彷彿是中間的交換區(如下圖)。

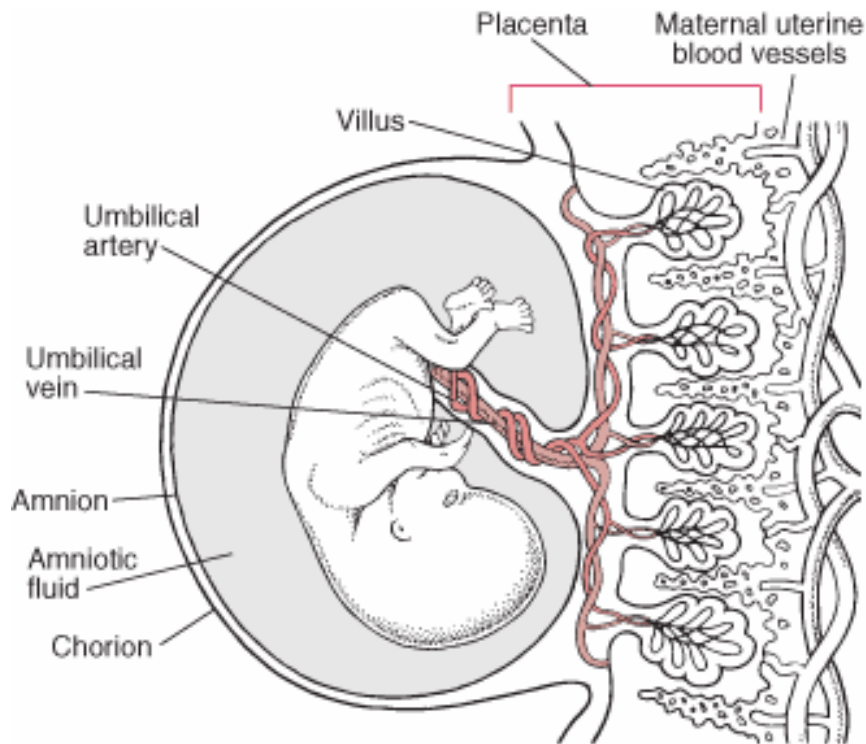


圖 胎盤提供母親與胎兒營養與血液在此交流但卻不直接接觸

胎盤是一種有如腫瘤般(tumor-like)器官，滋養層細胞會隨著懷孕時間的增加而增殖、移行、侵入至子宮，但卻又不像癌症般無限制成長；當懷孕 9 個月後胎盤逐漸發生鈣化現象，功能也開始減少，到妊娠 42 週時更是急速下降。為何會有如此變化，我們相信和細胞凋亡有關⁸，胎盤細胞經過酵素活化(enzyme activation)，或蛋白質表現(protein expression)啟動了計劃性的細胞死亡。Stephen C Smith et al.⁹ 於 1997 年第一位研究胎盤在不同懷孕週期的變化，發現胎盤細胞凋亡發生比例在妊娠末三個月(third-trimester)比妊娠前三個月(first-trimester)來的明

顯，胎盤這種一方面凋亡，一方面 持續增殖維持其功能，推測凋亡及增殖的發生對於胎盤的成長發育及病變扮演著重要角色。

3. TUNEL

TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling (TUNEL)是一種用來檢測細胞凋亡的分析方法。細胞凋亡有一項重要的特徵為細胞內的DNA會碎裂成片段(DNA fragmentation)，TUNEL可以有效的去探測DNA片段的產生，所以可以傳達細胞凋亡的訊息。TdT 為 terminal deoxynucleotidyl transferase，此種酵素可以在沒有DNA模板的情形下，連結核苷酸到DNA的3'-OH處。1992年，以色列科學家Gavrieli等人將TdT引為標定DNA片段的一個酵素，自此衍生出TUNEL此項技術。TUNEL的好處是可以在細胞凋亡發生的早期，即可偵測到DNA片段的產生，並且可以直接使用在組織切片上，觀察細胞凋亡發生的位置。所以TUNEL目前為廣泛接受與使用的一種細胞凋亡的分析方法。

4. Ki-67 表現

Ki-67 protein is a nuclear protein doublet，分子重量為 345-395 kDa，在維持細胞的增殖扮演重要角色，主要存在細胞週期中的G1、S、G2 及 mitosis，但不存在G0 cells。而Ki-67 labeling index (the percentage of cells in a tissue staining for Ki-67) 則意謂組織細胞增生比例(growth fraction)。臨床使用上對於某些細胞增生特別厲害的腫瘤

細胞，例如malignant melanoma、breast carcinoma、malignant Non-Hodgkin lymphoma，Ki-67 可以代表為細胞的增殖性標誌，而其 growth fraction 可以用來輔助診斷 並追蹤某些癌症¹⁰。

5. 骨誘導蛋白(Bone morphogenetic proteins, BMPs)

骨誘導蛋白為TGF- β 超家族的成員之一，最早由1965年由Urist 等人提出骨骼具有自我發生(autoinduction) 之特性，Urist 並將骨骼去除礦物質(demineralization)的萃取物植入皮下(subcutaneously) 或肌肉中(intramuscularly)，發現此類萃取物可又到異位骨的形成¹¹，BMPs 為多重功能的細胞激素(cytokine) 是轉型因子TGF- β 超家族的成員之一，目前已然發現屬於BMPs 家族蛋白質已高達20餘種。BMPs 具有調節細胞之增生、分化及凋亡作用，另外與胚胎軸向的決定、神經系統及器官生成、組織修復和再生、骨誘導及新生有著密切的關係¹²。部分疾病已經證實與胚胎時期BMPs 基因受到抑制或過度表現相關；當BMP-2 受抑制時，胚胎有羊膜或絨毛膜及心臟發育上的缺陷，無法存活；BMP-4 受抑制時，因無中胚層的發育，胚胎在早期便會死亡；BMP-7 受抑制時造成腎臟及眼睛發育有重大缺陷，在肋骨、頭骨及四肢發育中亦會造成缺陷，其突變時則會造成多趾症 (polydactyly)；BMP-6 的過度表現則造成牛皮癬。

6. CD34

CD34 是一種 分子量110 kDa transmembrane glycoprotein 存在於leukemic cells, endothelial cells and stem cells , 此外在神經、毛囊、muscle bundle、唾液腺中也可發現，其作用仍未明確，目前臨床上用來診斷leukemia及某些血管腫瘤的分類。

7. 血管內皮生長因子(Vascular Endothelial Growth Factor, VEGF) and 血管內皮生長因子接受體(Vascular Endothelial Growth Factor- receptor, VEGFR)

血管內皮生長因子是一種主要作用於血管內皮細胞的多功能細胞因子，主要作用在促進血管的生成，刺激內膜細胞的移行及生長，維持新生微血管的完整性(integrity)²²及通透性，它廣泛存在人體組織中，在維持血管內皮細胞的穩定性扮演重要角色；在某些病態組織中，例如 solid tumors，則會過度表現。VEGF 是一種分泌性醣蛋白，分子量介於24 – 46 kDa，結構具有高度保守性，其醣蛋白單體透過二硫鍵結合形成同源二聚體(disulphide-linked homodimeric glycoprotein)才具有生物學活性²¹，VEGF是一個結構相似的生長因子家族，其成員包括VEGF-A(通常所謂的VEGF)、VEGF-B、VEGF-C、VEGF-D 和胎盤生長因子(placenta growth factor)。VEGF 在1993年被發現存在子宮內膜²³及懷孕的胎盤內²⁴，在老鼠實驗中破壞胚胎VEGF則造成胚胎早期死亡²⁵。

目前已知VEGF蛋白質家族成員中有三種接受體，分別是VEGFR-1、VEGFR-2、VEGFR-3，存在於胎盤的vascular endothelial cell 及 trophoblastic layer。不同的VEGF與其receptor結合有不同的作用，例如VEGFR-3主要表現在淋巴管內皮細胞，而VEGFR-2主要調控新生血管的形成。而和胎盤關係最密切的是VEGFR-1³⁰。

第二節 研究目的

針對子癩前症病人胎盤絨毛上滋養層細胞，研究其細胞增殖與凋亡兩者的表現與正常胎盤是否有所不同，藉此來了解及解釋子癩前症的可能病理機轉。

第二章 研究方法

1. 為評估比較子癩前症與正常者胎盤滋養層細胞在凋亡差異，我們使用 TUNEL stain 及 免疫組織化學染色法(Immunohistochemistry stain ; IHC)分析Bcl-2。
2. 為比較兩者在胎盤滋養層細胞增殖不同，利用的標誌為Ki-67, 。
3. 在胎盤絨毛功能的評估，我們使用下列標誌：骨誘導蛋白(bone morphogenetic protein, BMP)、CD34、 VEGF(vascular endothelial growth factor)及 VEGF-receptor II。分析絨毛內血管內膜細胞表現的差異。

第一節 研究材料

一. 材料來源：皆來自童綜合醫院婦產科孕婦生產後的胎盤。

二. 化學藥品：

1. 組織學染色 Hematoxylin – Eosin stain,

Hematoxylin (Merck)

Eosin (Merck)

Xylene (Takaaki)

Alcohol (Takaaki)

Ethanol absolute (Panreac)

Mounting medium (Merck)

2. 免疫組織化學染色

0.1M PBS (10X; PH=7.4)

DAB (Sigma)

Xylene (Takaaki)

Alcohol (Takaaki)

Ethanol absolute (Panreac)

0.1M Citrate acid buffer(PH 6.0)

5 % Skim milk

Mounting medium

三. 試劑、抗免疫組織化學染色

1. Primary antibody :

- 抗體BMP ; 來源: Santa Cruz, sc-6899 ; 稀釋倍數1 : 100
- 抗體BMPR-II ; 來源: Santa Cruz, sc-5683 ; 稀釋倍數1 : 100
- 抗體 Bcl-2 ; 以 DakoCytomation Antibody Diluent with Background Reducing Components ; S3022稀釋 ; 稀釋倍數1 : 50
- 抗體 CD34 ; 以 DakoCytomation Antibody Diluent with Background Reducing Components ; S3022稀釋 ; 稀釋倍數1 : 50

2. Secondary antibody :

- 抗體anti-goat biotin;來源: VECTASTAIN, VECTOR ; 稀釋倍數1 : 200
- 抗體anti-mouse biotin;來源: Invitrogen ; 稀釋倍數1 : 200

四. 器材

脫水滲蠟機(LIPSHOW)

包埋機Tissue Block System TBS88 (Medite)

石蠟切片機(Shandon)

冷凍切片機(Shandon crytome cryostat series)

組織均質機(IKA LABORTECHNIK)

離心機Microcentrifuge (Beckman)

UVIttec-UVIdoc 影像照相系統(GeneKu Biotech)

光學顯微鏡(Olympus BX50)

ELECTRONIC EYEPIECE 照相軟體(Young-Health Co.,Ltd.)

第二節 研究設計

1. 胎盤組織取材

共取 14 位孕婦的胎盤(7 位為正常者胎盤，7 位經診斷為子癩前症)，生產方式皆為剖腹生產，採樣時間為生產胎盤取出後，馬上進行重量稱重。迅速選取胎盤母體面靠近臍帶處(避開鈣化或不正常出血處)約 1.0 cm x 1.0 cm x 1.0 cm 小塊，放入 10%中性福馬林固定。生產前已先向孕婦解說實驗用途，並取得胎盤採樣同意書(如附錄)，採樣後胎盤由孕婦自行帶回處理。子癩前症定義為本來正常無高血壓的婦女，在懷孕 20 週以後，血管收縮壓超過 140 mmHg 且舒張壓超過 90 mmHg，且尿液試紙蛋白尿超過 1+。對照組為無高血壓、糖尿病或其他內科疾病史，尿液試紙皆無蛋白尿。

2. 本實驗的設計流程圖(如表二)。

3. 胎盤組織脫水、包埋與切片

將胎盤組織浸泡於10%中性福馬林固定至少24 小時後，再移至水槽以流動的水沖洗約15 分鐘。接著進行組織脫水，置入組織脫水機Duplex process，依一定程序以漸增濃度之酒精70% alcohol → 80% alcohol → 80% alcohol → 95% alcohol → 95% alcohol → 100%alcohol → 100% alcohol → 二甲苯(Xylene) → Xylene 軟蠟(Paraffin) → Paraffin，此過程經14小時後，再於蠟缸中取出組織用Tissue block system 進行包埋固定，最後進行組織切片，厚度5 μ m，置放玻片於室溫通風一天使其乾燥。

4. 組織染色(Hematoxylin & Eosin stain ; H&E stain)

將各別含有胎盤組織切片的玻片置於65 烘箱30 分鐘至溶蠟，再用二甲苯 浸泡5 分鐘共3 次使之脫蠟，接著浸泡於濃度漸減之酒精(100% alcohol，5 分鐘 100% alcohol，5 分鐘 95% alcohol，5 分鐘 95% alcohol，3 分鐘 75% alcohol，3 分鐘)水化後，以流動的水沖洗3 分鐘，將玻片置於Hematoxylin 染缸浸泡30~90 秒，使細胞核呈藍色，再以流動的水沖洗10 分鐘，將玻片置於Eosin 染缸浸泡30~60 秒，使組織纖維與細胞質呈不等程度的粉紅色。接著浸泡於濃度漸增之酒精(75% alcohol 95% alcohol 95% alcohol 100% alcohol 100% alcohol)

進行脫水，再經Xylene 浸潤組織後，以封片膠封片放置於室溫下通風致乾燥，於光學顯微鏡(Olympus , BX50) 觀察並照相。

5. TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling (TUNEL) stain

TUNEL analysis was performed using the in situ Cell Death Detection Kit TMR Red (Roche Molecular Biochemicals; Indianapolis, IN) according to the manufacturer's protocol

6. 免疫組織化學染色法(Immunohistochemistry stain ; IHC)

將含有胎盤組織切片的玻片置於65℃烘箱30分鐘至溶蠟，再用二甲苯浸泡5分鐘共3次使之脫蠟，接著浸泡於濃度漸減之酒精(100% alcohol , 5分鐘 100% alcohol , 5分鐘 95% alcohol , 5分鐘 95% alcohol , 3分鐘 75% alcohol , 3分鐘)水化後，以流動的水沖洗3分鐘。將玻片放置於含0.01M Citrate buffer (pH6.0) 經微波加熱(750W) 10分鐘，再隔以流動的水隔水降溫10分鐘。接著將玻片取出以1X PBS 緩衝液浸泡震搖5分鐘，連續3次。再浸置於3% H₂O₂ 中反應10分鐘，以去除內生性過氧化氫酵素，再以1X PBS 緩衝液浸泡震搖5分鐘，連續3次。接著浸置於5%脫脂奶粉室溫下反應1小時，作為阻斷劑以防止之後抗體的非特異性結合，降低偽陽性。以1X PBS 緩衝液沖洗潤濕，以洗去片子上殘存多餘的5%脫脂奶粉。隨後於實驗組各別加入一級抗體(Primary antibody)，而對照組則加入1X PBS 緩衝液作為

Negative control，皆於4℃下反應16小時(overnight)，再以1X PBS 緩衝液浸泡震搖5分鐘，連續3次。接著加入含有biotin-conjugated 之二級抗體(Second antibody)，於37℃下反應一小時，再以1X PBS 緩衝液浸泡震搖5分鐘，連續3次。接著加入Avidin-Biotin Complex Kit (10µl A+ 10µl B +100µl 1X PBS, ABC kit) 於37℃下反應一小時，再以1X PBS 緩衝液浸泡震搖5分鐘，連續3次。再加入DAB 呈色劑 (0.05gDAB + 100ml 1X PBS + 67µl H₂O₂) 反應3~5分鐘至呈色，再以二次水浸泡震搖5分鐘，連續3次。接著浸泡於Hematoxylin 中40秒作為背景染色，再以流動的水沖洗10分鐘。放置於烘箱中使其乾燥，再浸泡於二甲苯，便可使用封片膠封片放置於室溫下通風致乾燥後，於光學顯微鏡(Olympus，BX50) 觀察並照相。

第三節 統計方法

1. 在光學顯微鏡 20x10 倍率下，避開明顯發炎或鈣化地方，隨機任取 5 個視野，計算經免疫組織化學染色法染上的滋養層細胞(例如染成棕色) 數目，除以在計算該視野下正常滋養層細胞數目再乘以 100(染色細胞/ 正常細胞 X 100)%，即代表百分率。
2. Semiquantitative immunohistochemical Remmele score(IRS)¹³ 評估免疫化學染色強度(intensity)和分佈範圍(distribution patterns)，將光學顯

微鏡下染色細胞強度分成四級：0 為無染色；1 為 微弱(weak)；2 為 中度(moderate)；3 為強度(strong staining)。細胞分佈定義為染色細胞所佔百分比：0 為無染上；1 為少於 10%細胞被染色；2 是 11-50%；3 是 51-80%；4 是大於 81%。將兩者分數相乘即為 IRS。

3. 統計分析軟體為 Statistical Package for Social Sciences (SPSS™) for Window XP version 11，本研究實驗數據以平均值±標準差(Mean±SD)來表示。在比較各組間差異時。P 值 < 0.05 為統計學上有顯著差異。(Mann Whitney *U* test)。

第三章 研究結果

1. 孕婦臨床資料

實驗共收集 7 位子癲前症病人胎盤及 7 位正常剖腹生產者胎盤，這 14 位孕婦的臨床資料(表三)，分析其基本資料後發現：母親生產體重在子癲前症病人比正常者來的重(表四)，懷孕妊娠週數及胎兒出生體重在子癲前症病人則明顯不足正常者，胎兒出生狀況(Apgar score)在子癲前症病人，分數也明顯較低。而子癲前症者胎盤重量比正常者平均較重，但這並無達到統計學意義。

2. Apoptosis Expression

細胞凋亡的評估是以 TUNEL 方法來表現，在滋養層細胞經 TUNEL stain 為棕色者代表陽性(圖一)，在子癩前症胎盤裡陽性比例平均值 $0.37\% \pm 0.04\%$ ，而正常者為 $0.18\% \pm 0.05\%$ (表五)，具統計學意義。

3. Bcl-2 Expression

Bcl-2 protein 免疫組織化學染色在子癩前症與正常者胎盤 trophoblast cells 如(圖二)，經 IRS(Semiquantitative immunohistochemical Remmele score)分析兩者平均值(圖三)，在子癩前症胎盤裡陽性比例平均值 4.03 ± 1.25 ，而正常者為 3.70 ± 0.86 ，雖然子癩前症滋養層細胞質內 Bcl-2 蛋白表現較正常者較低，但並無統計明顯顯著。

4. Ki-67 Expression

任何深棕色細胞核染色代表是陽性反應(圖四)，計算在陽性反應細胞核數目所占所有細胞百分比後(staining index)，子癩前症滋養層細胞 Ki-67 positive index 是 $4.60 \pm 0.20\%$ ，正常胎盤則為 $3.96 \pm 0.39\%$ ，子癩前症表現比正常者較明顯(表六)， $P < 0.05$ 。

5. VEGF & VEGF receptor-1

VEGF 免疫組織化學染色在子癩前症與正常滋養層細胞如(圖五)，經 IRS(Semiquantitative immunohistochemical Remmele score)分析與正常者平均值(圖六)，在子癩前症胎盤裡陽性比例平均值 7.02 ± 1.15 ，而

正常者為 6.68 ± 0.73 ，雖然子癩前症滋養層細胞質內 VEGF 蛋白表現較正常者較高，但並無統計明顯顯著($P>0.05$)。VEGF receptor-I 在正常胎盤中並無發現，而在子癩前症病人的胎盤絨毛內血管的內膜細胞及滋養層細胞上卻可以發現(圖七)。

6. BMP family (bone morphogenetic protein)

BMP family (bone morphogenetic protein)包括 BMP-2、BMP-6、BMP-7，BMP-receptor，除了在 BMP-receptor 有輕度染上外，其他 BMP protein 則無發現染色結果(表七)，在子癩前症與正常者表現並無差異(圖八)。

7. CD34 抗體

胎盤經過 CD34 抗體的免疫組織化學染色後，主要是表現在絨毛內血管的內膜細胞上(圖九)，在正常者胎盤與病態胎盤兩者並無明顯不同，血管內膜細胞皆染成棕紅色。

結論

比較子癩前症病人胎盤滋養層細胞與正常者表現發現：細胞凋亡發生率、及Ki-67的表現在子癩前症較正常高，而Bcl-2 protein表現則較低(雖然統計學上無明顯意義)；其他標誌例如 BMP family(Bone morphogenetic proteins, 骨誘導蛋白)、CD34、VEGF & VEGF receptor-I 則無明顯差異。

第四章 討論

第一節 結果討論

胎盤的凋亡是一種正常的生理現象，相較於 first-trimester 的胎盤，third-trimester 的胎盤發生凋亡機率的確是比較高，而發生位置也不因距離臍帶遠近而影響¹⁴。雖然診斷細胞凋亡可以藉由顯微鏡下的特殊形態(例如：condensation of nuclear heterochromatin, first as a crescent apposed to nuclear membrane, later into single or multiple dense bodies)，但這並不是簡單的事，而電子顯微鏡(electron microscopy)則是鑑別凋亡的”gold standard”¹⁵，但昂貴器材並不是容易取得。本實驗標本先經過 H&E stain，但在光學顯微鏡下並無法確實區分兩者明顯異常凋亡。再採用 TUNEL 方法評估胎盤凋亡。正常胎盤的發生率，在使用 TUNEL 檢測的 median rate 是 0.51%¹⁶，我們結果是正常胎盤為 0.18%，子癩前症則為 0.37%，雖然較其他學者研究結果較低；但子癩前症較正常胎盤的確較明顯。目前已經證實，子癩前症的胎兒會有生長遲緩(intrauterine growth retardation)和子宮胎盤的循環不良，增加組織的缺氧及凋亡。

Bulmer¹⁷ 發現大部份的滋養層細胞核內有 Ki-67 的活性。Gerard¹⁸ 更是發現隨著懷孕週數的增加，Ki-67 的表現逐漸減少。欲研究滋養層細胞生物活性，Ki-67 被認為是具有高準確度的標誌¹⁹，我們的研究結果發

現，子癩前症的胎盤滋養層細胞 Ki-67 的表現比正常者明顯，這結果和其他學者相同²⁰，原因為何？目前尚未定論，認為可能因為子癩前症的胎盤滋養層細胞受到傷害，為了修復受傷細胞，促使細胞核增殖反應，Ki-67 活性也增加。

正常懷孕情況下胎盤滋養層細胞會侵入母體子宮 decidua，remodel the spiral arteries，改變為低阻力血管(low resistance vessels)，以利母體與胎兒血液交換；而對於子癩前症的滋養層細胞其侵入至子宮功能是異常的，造成胎盤血流量不足及胎兒缺氧²⁶，而缺氧導致胎盤減少分泌 placenta growth factor (PIGF)²⁷，up-regulate VEGF expression²⁸，這推論和我們的結果有相吻合，我們結果發現 VEGF 在子癩前症的表現(mean \pm SD, 7.02 \pm 1.15)比正常來的較多(mean \pm SD, 6.68 \pm 0.73)，雖然統計學上並無明顯差別。VEGF 表現的增加可能不是子癩前症的特有改變，但確是和胎盤功能的不正常和缺氧有關。VEGF 和其接受體是胚胎血管發育的基本元素，即使破壞 a single VEGF allele 導致死亡^{21,25}，VEGF 和接受體在整個懷孕過程中均有作用²⁹，而病態的懷孕如子癩前症，其表現的強度和疾病的嚴重程度及懷孕週數有關³⁰。

VEGF 接受體有三種：VEGFR-1 and VEGFR-3 主要在 syncytiotrophoblastic layer，而 VEGFR-2 則主要在胎盤的血管內膜細胞

上，我們的結果則發現子癩前症的滋養層細胞及內膜細胞上均有 VEGFR-1 表現，而正常者幾乎不表現。

BMPs 具有調節細胞之增生、分化及凋亡作用，目前已知部份疾病與胚胎時期 BMPs 基因受到抑制或過度表現相關。BMPs 在子癩前症的角色未知，我們研究資料發現 BMP protein 在胎盤子癩前症上的表現不管正不正常均不明顯，而 BMP receptor 在子癩前症則為弱陽性，如何解釋這表現是須要更深入的研究才能證實。

CD34 是一種 transmembrane glycoprotein，存在血管的內膜細胞上，我們的結果顯示子癩前症與正常者在免疫組織化學表現強度上(stain intensity)無明顯差異，這和 Egbor, M.³¹ 學者部份吻合，因為單純子癩前症而無胎兒生長遲緩者(fetal growth restriction)，胎盤絨毛在長度、體積、直徑、表面積是與正常無差別；但若合併有胎兒生長遲緩則在胎盤絨毛及血管形狀則有明顯與正常不同。因為我們病人中並非全為嚴重子癩前症，且數量不夠多，無法就胎兒體重不足者再分類。

第二節 研究限制

在利用光學顯微鏡分析計算結果時，由於所計算數目不少，例如一個病人胎盤就數超過 2000 個細胞，長時間下來或許增加判斷上的誤差。本篇研究共取 14 位胎盤組織，來源數目仍稍不夠，另外如果能更進一步分析做

蛋白質萃取分析，則像 BMP family, CD34, VEGF(vascular endothelial growth factor) & VEGF receptor-II，則會更是完美。

第五章 結論與建議

第一節 結論

或許是因為 anti-apoptosis Bcl-2 表現異常，或是胎盤絨毛微血管內膜細胞功能異常造成胎盤 hypoxia，在子癩前症病人胎盤上，滋養層細胞發生 apoptosis 的比例較正常者高；而 proliferation marker – Ki-67 及 VEGF 的表現也比正常者較高；這間接說明了胎盤滋養層細胞 apoptosis 和 proliferation 的表現，在子癩前症的病理機轉上扮演著一定的角色。

第二節 建議

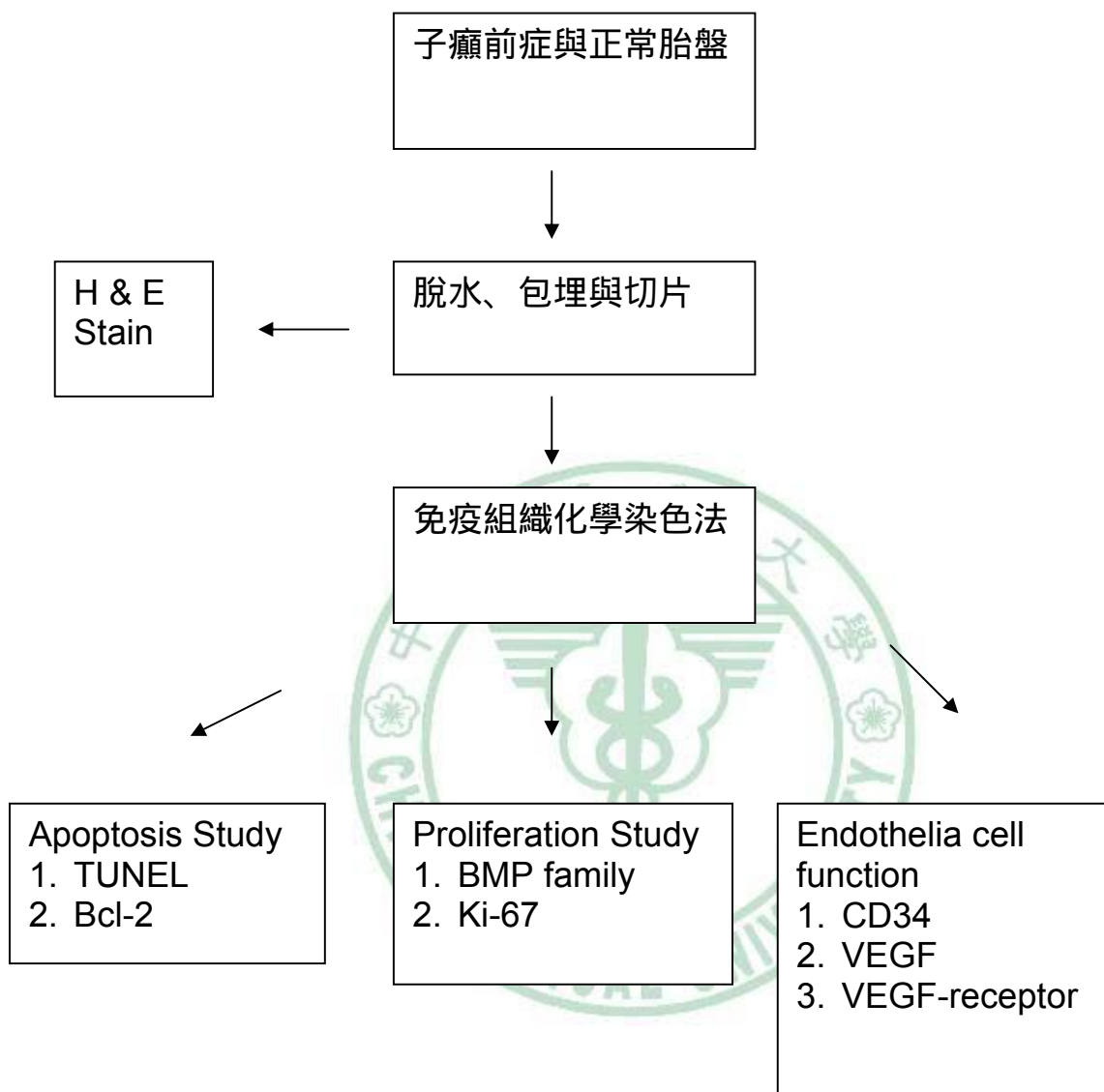
骨誘導蛋白在胎盤上的研究並不多，可以由此再收集多一點病人，並進一步做到蛋白質萃取，分析和胎盤疾病的相關性。另外可以更細分出子癩前症合併胎兒體重不足、子癩前症但胎兒體重正常及無子癩前症者，分析三者之間胎盤功能表現的不同。

表一：子癩前症輕度與重度臨床分類

Indications of Severity of Preeclampsia

Abnormality	Mild	Severe
Systolic blood pressure	>140 mmHg	>160 mmHg
Diastolic blood pressure	<100 mmHg	>110 mmHg
Proteinuria	Trace to 1+	> 2+
Headache	Absent	Present
Visual disturbance	Absent	Present
Upper abdominal pain	Absent	Present
Oligouria	Absent	Present
Convulsion	Absent	Present
Serum creatinine	Normal	Elevated
Thrombocytopenia	Absent	Present
Liver enzyme elevation	Minimal	Marked
Fetal-growth restriction	Absent	Obvious
Pulmonary edema	Absent	Present

表二：實驗設計流程



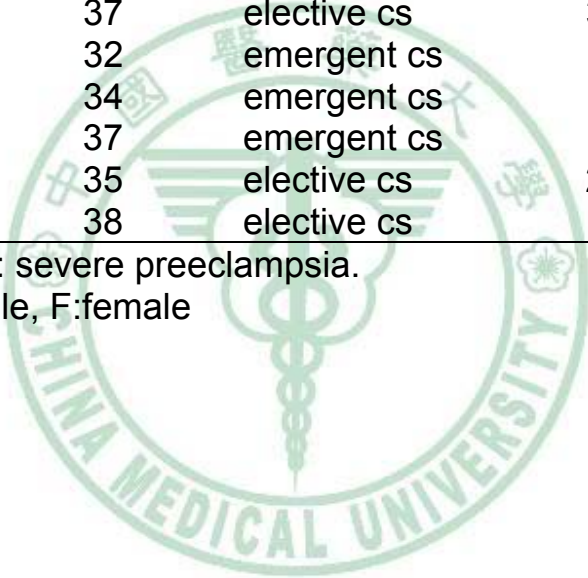
表三：14 位孕婦的臨床資料

Clinical characteristics

Case	Clinical category	Parity	Gestation(wk)	Reason for delivery	fetus weight(gm), sex	Apgar score
1	Normal	1	39	previous cs	3080, F	9 --> 10
2	Normal	1	38	previous cs	2968, F	8 --> 9
3	Normal	1	38	previous cs	2878, F	9 --> 10
4	Normal	1	38	previous cs	3150, M	9 --> 10
5	Normal	1	37	previous cs	3200, M	9 --> 10
6	Normal	1	38	previous cs	2887, F	9 --> 10
7	Normal	0	38	breech	3194, M	9 --> 10
8	MP	0	38	elective cs	2964, M	7 --> 8
9	MP	0	37	elective cs	3182, M	8 --> 9
10	SP	3	32	emergent cs	1600, F	7 --> 8
11	SP	0	34	emergent cs	1748, F	7 --> 8
12	SP	0	37	emergent cs	1860, M	7 --> 8
13	MP	0	35	elective cs	2450, M	8 --> 9
14	MP	0	38	elective cs	3100, F	9 --> 10

MP: mild preeclampsia. SP: severe preeclampsia.

cs: cesarean section. M: male, F: female



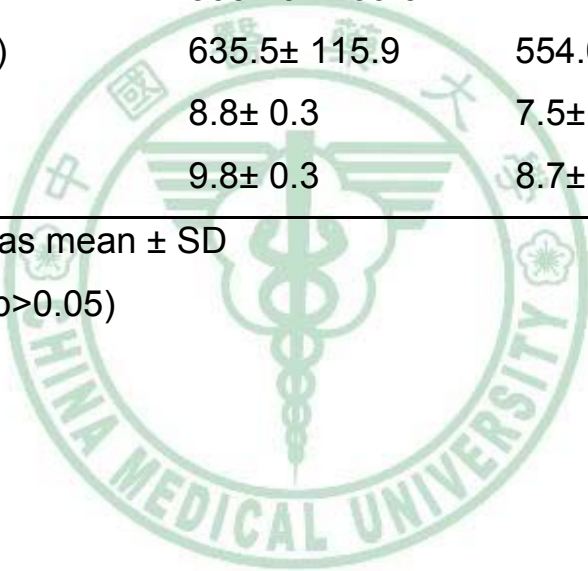
表四：子癲前症病人和正常者孕婦臨床資料的比較

Comparison of clinical characteristics

Characteristics	Normal (n=7)	Preeclampsia(n=7)	p-value
Maternal age(years)	30.1± 4.3	31.7± 4.1	NS
Maternal height(cm)	156.7± 8.3	158.8± 5.4	NS
Maternal weight(kg)	68.9± 11.4	83.6±11.9	0.03
Parity	0.8± 0.3	0.4± 1.1	NS
Gestation age(weeks)	38.0± 0.6	35.8± 2.2	0,03
Fetus weight(gm)	3051.0± 139.6	2414± 680.3	0.02
Placenta weight(gm)	635.5± 115.9	554.0± 142.8	NS
Apgar-1	8.8± 0.3	7.5± 0.7	0.02
Apgar-5	9.8± 0.3	8.7± 0.7	0.04

Data are presented as mean ± SD

NS, not significant (p>0.05)



表五 子癩前症滋養層細胞內細胞凋亡統計與正常比較

Apoptotic Nuclei in Placental trophoblast Samples

Nuclei	Preeclampsia (n=7)	Control (n=7)	P
Total apoptotic nuclei	9.0 ± 0.8	5.2 ± 1.4	<.01
Total nuclei	2495 ± 112.4	2631 ± 137.7	NS
% apoptotic	0.37 ± 0.04	0.18 ± 0.05	<.01

Data are presented as mean ± SD

NS, not significant (p>0.05)

表六：子癩前症滋養層細胞內細胞 Ki-67 的表現與正常者比較

Ki-67 Nuclei in Placental trophoblast Samples

Nuclei	Preeclampsia (n=7)	Control (n=7)	P
Total Ki-67 nuclei	113.8 ± 5.1	99.1 ± 8.9	0.03
Total nuclei	2471.4 ± 65.5	2501.2 ± 62.7	NS
Ki-67 stain index(%)	4.60 ± 0.20	3.96 ± 0.39	0.03

Data are presented as mean ± SD(standard deviation)

NS : not significant

表七 BMP family 的免疫組織化學染色統計

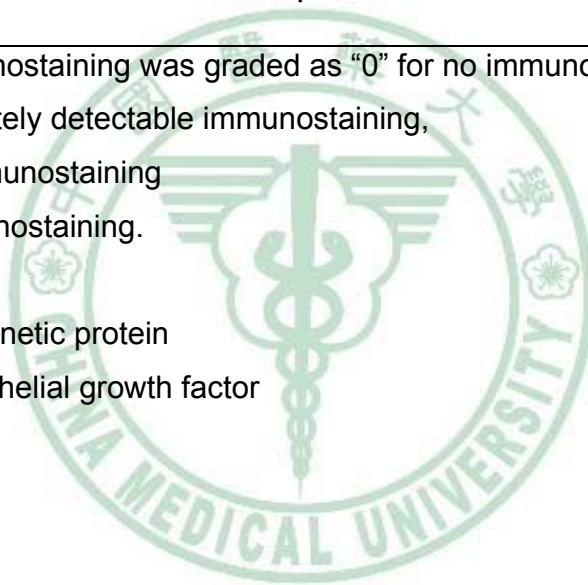
Immunohistochemical staining for BMP family in normal and preclampsia placentas

	Preeclampsia (n=7)	Control (n=7)
BMP-2	0	0
BMP-6	0	0
BMP-7	0	0
BMP receptor	†	0

The intensity of immunostaining was graded as “0” for no immunostaining, “+” for weak but definitely detectable immunostaining, “++” for moderate immunostaining “+++” for strong immunostaining.

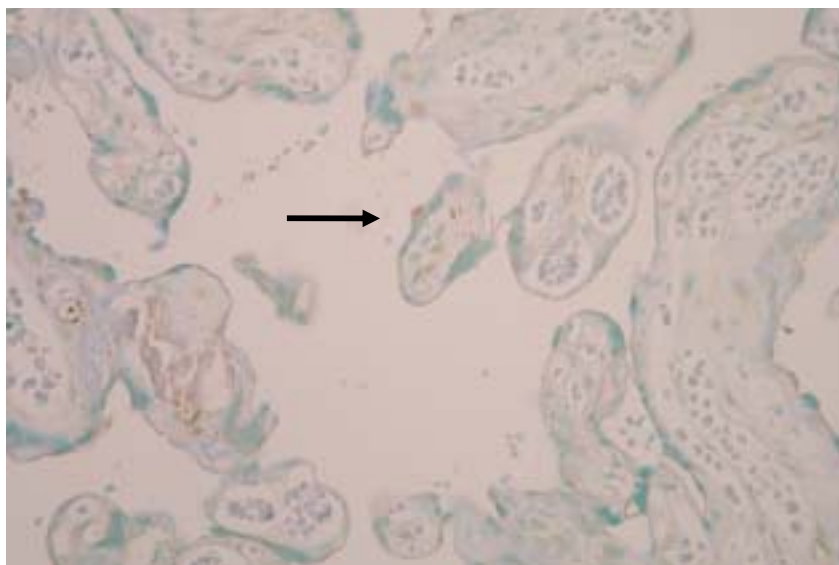
BMP: Bone morphogenetic protein

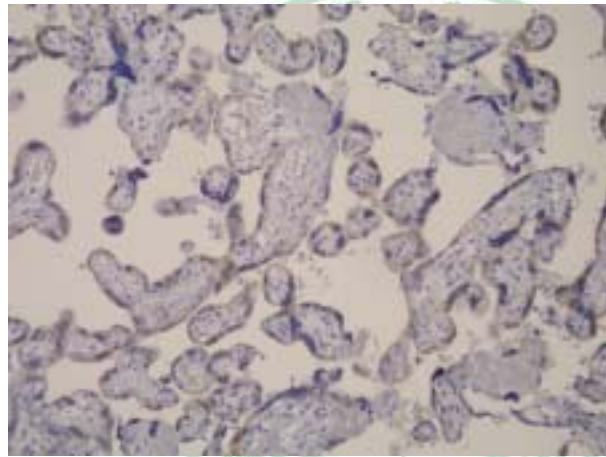
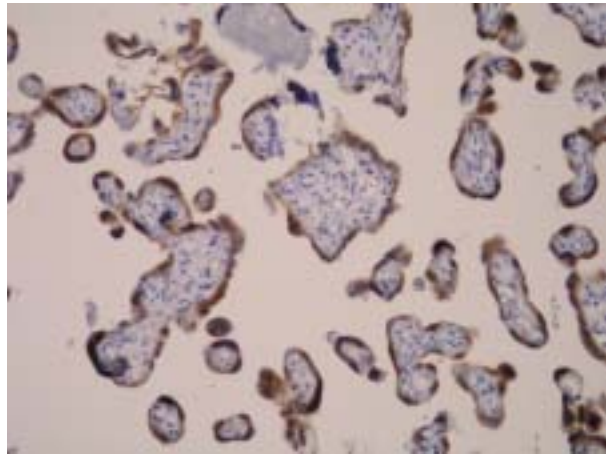
VEGF: vascular endothelial growth factor



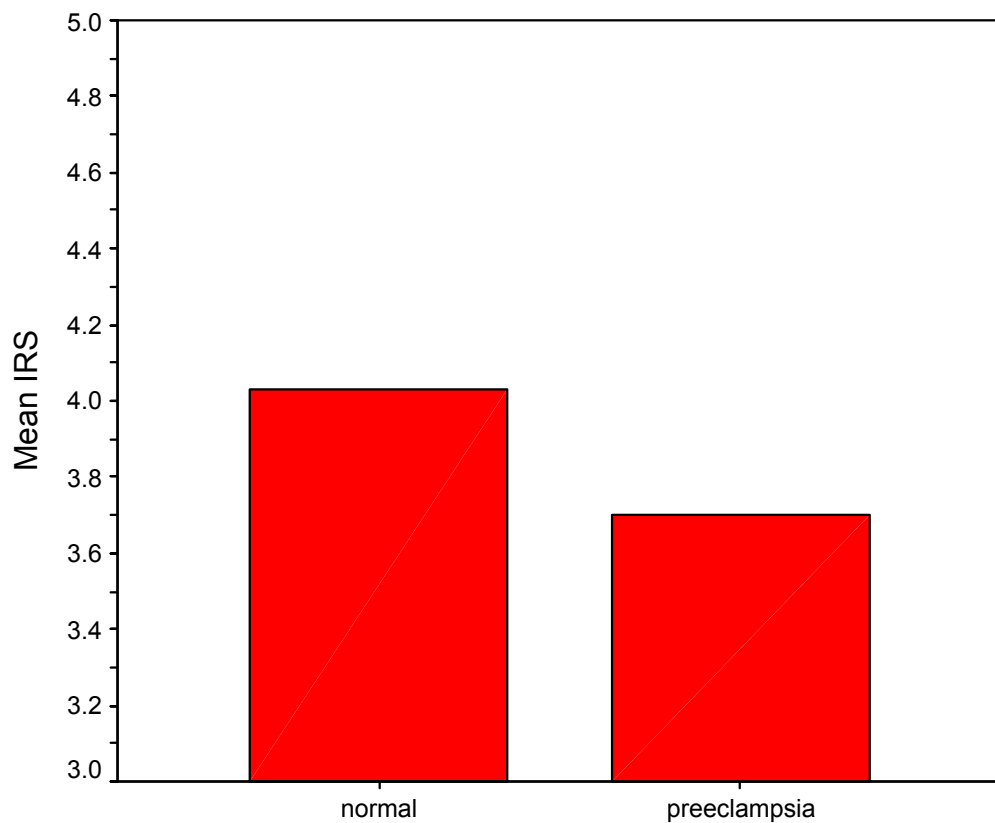
圖一：胎盤滋養層細胞經 TUNEL 染色

背景為藍色，陽性地方為棕色(箭頭所指)，原始放大倍數 X 200。





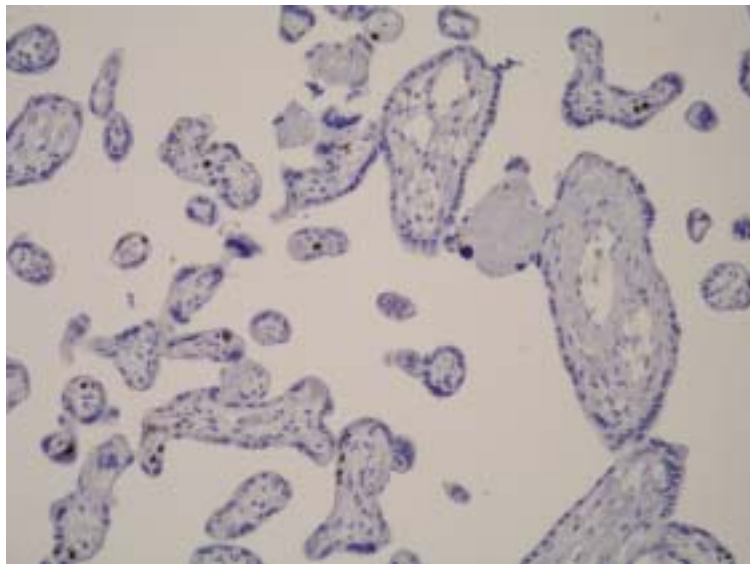
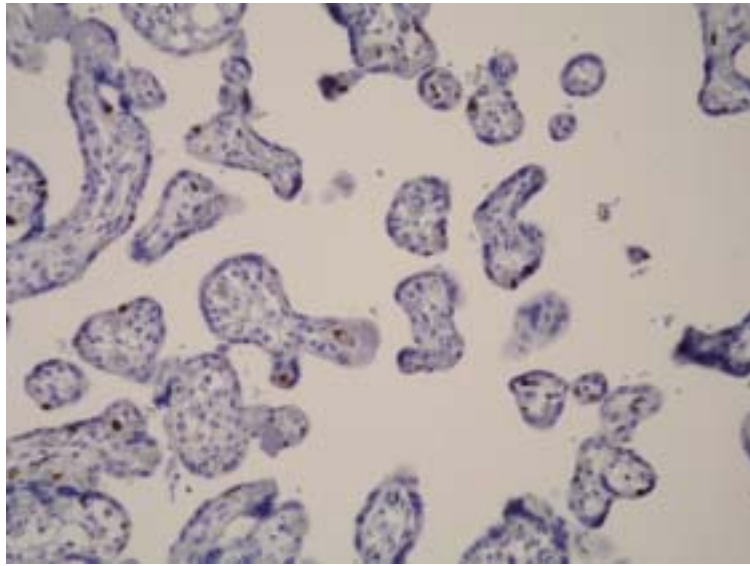
圖二：Bcl-2 蛋白在胎盤滋養層細胞的細胞質經免疫組織化學染色
正常胎盤(A) 與子癲前症(B) BCL-2 蛋白在細胞質(染成棕色)
的表現(原使放大倍率 X 200)



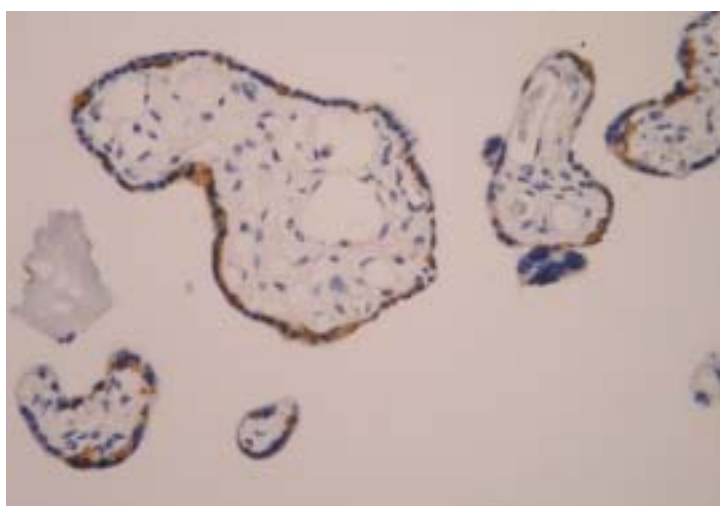
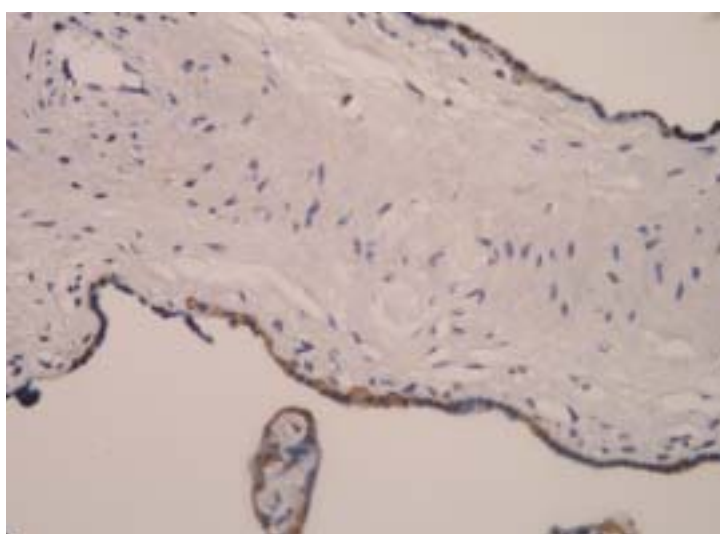
圖三 子癩前症胎盤滋養層細胞 IRS 與正常者的比較

在子癩前症胎盤滋養層細胞 IRS 陽性比例 mean \pm SD:4.03 \pm

1.25 , 而正常者為 3.70 \pm 0.86 (Not significance)



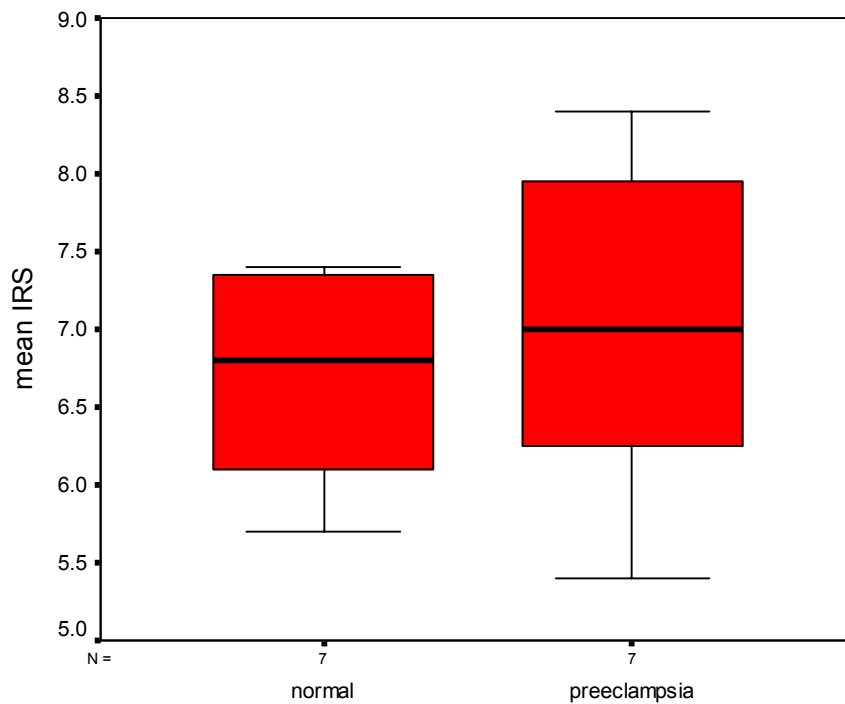
圖四 Ki-67 在胎盤滋養層細胞內經免疫組織化學染色法
深棕色細胞核染色代表是陽性反應，上圖為正常胎
盤，下圖為子癩前症。(原使放大倍率 X 200)



圖五：VEGF 在胎盤絨毛上的免疫組織化學染色

正常胎盤(上) 與子癲前症(下) 在絨毛滋養層細胞上

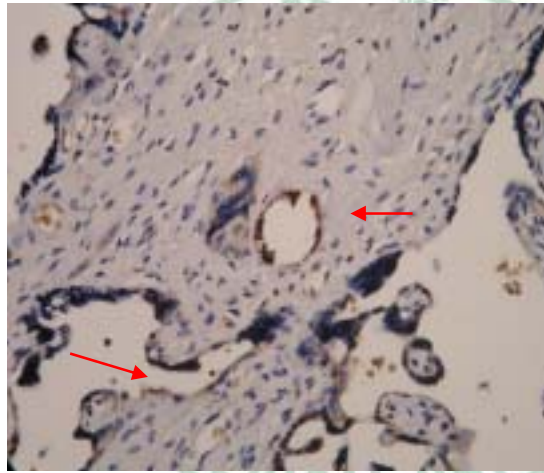
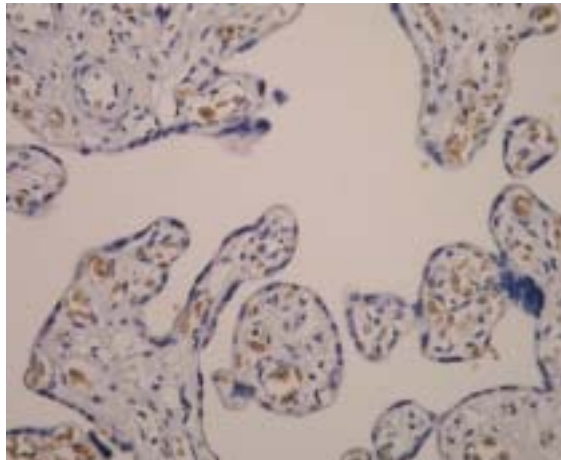
VEGF 細胞質(染成棕色)的表現(原使放大倍率 X 400)



圖六 VEGF 在子癩前症胎盤滋養層細胞 IRS 與正常者的比較

VEGF 在子癩前症胎盤滋養層細胞 IRS 陽性比例 mean \pm SD:

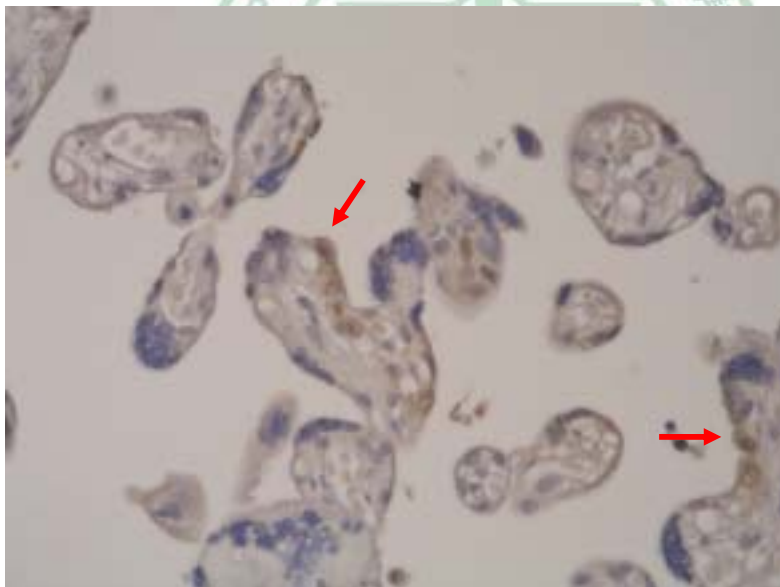
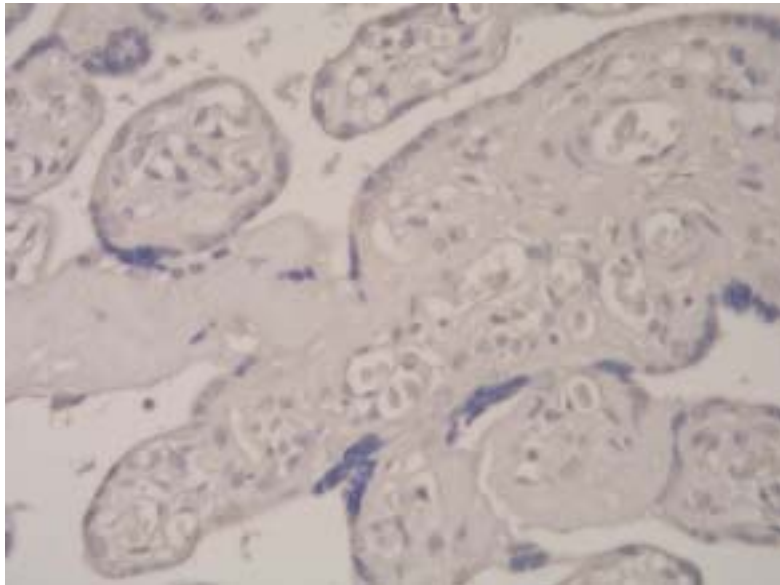
7.02 \pm 1.15 , 而正常者為 6.68 \pm 0.73 (P>0.05) , 子癩前症者較高。



圖七：VEGF receptor I 在胎盤絨毛上的免疫組織化學染色

正常胎盤(上) 與子癩前症(下) 在絨毛 trophoblast 上

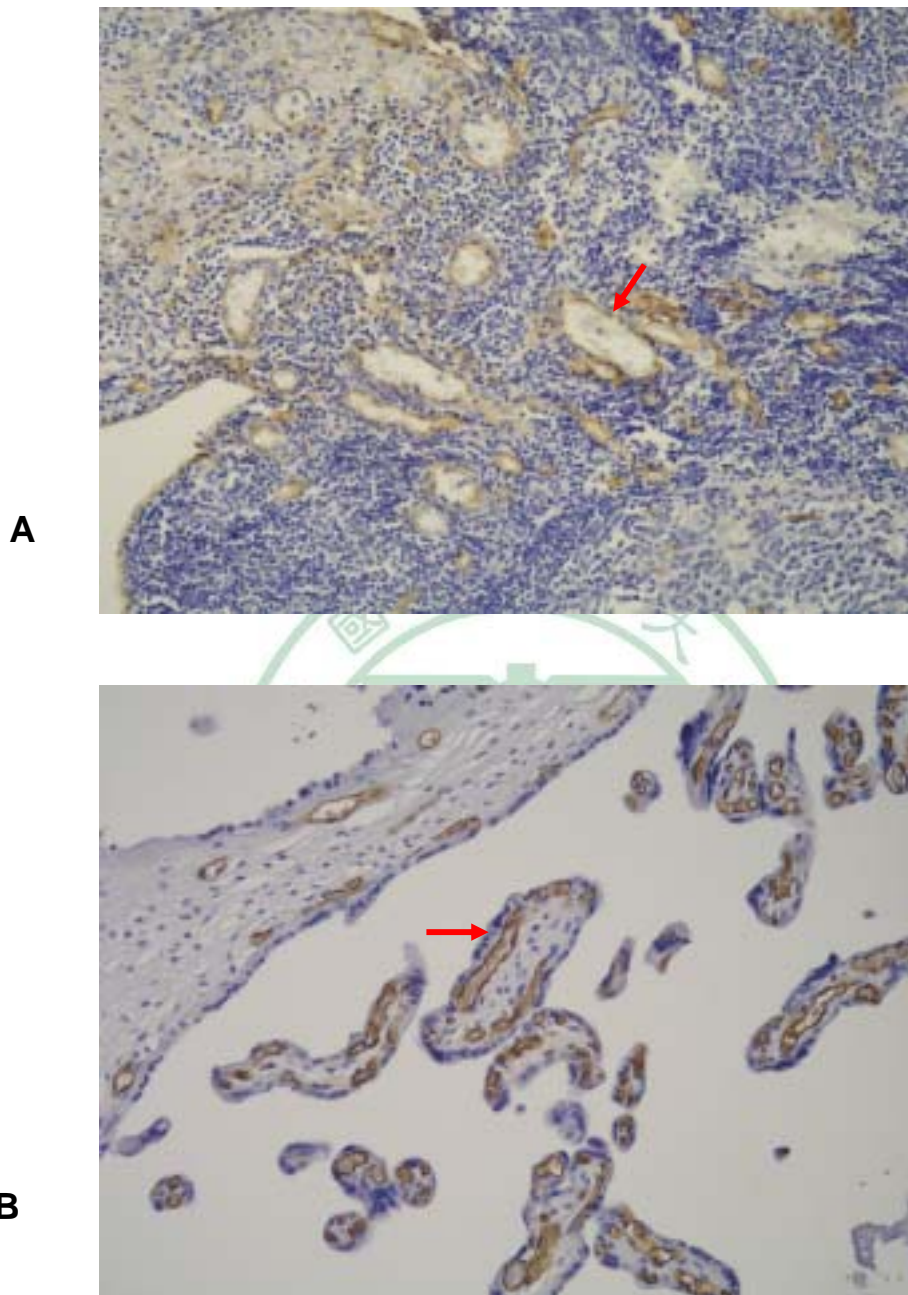
VEGF receptor-I 的表現；在正常胎盤的 trophoblast 及血管的 endothelial cell 上沒有發現 VEGF receptor-I，而在子癩前症則可發現。如箭頭處。(原使放大倍率 X 400)



圖八：BMP receptor 在胎盤絨毛上的免疫組織化學染色

正常胎盤(上) 與子癩前症(下) 在絨毛 trophoblast 上 BMP

receptor 細胞質的表現，正常者無染上，子癩前症(箭頭)



圖九：CD34 在胎盤絨毛上的免疫組織化學染色

(A)CD34 的陽性對照組，在血管內膜細胞染成棕紅色(箭頭)。

(B)子癲前症胎盤絨毛內血管內膜細胞也同樣染色(箭頭)。

(原使放大倍率 X 200)

參考文獻

1. U.S. Department of Health, Education, and Welfare. The Collaborative Perinatal Study of the National Institute of Neurological Diseases and Stroke: The Women and their Pregnancies(DHEW Publication No. (NIH) 73-379). Bethesda, MD, U.S. Department of Health, Education, and Welfare, Public Health Service, National Institutes of Health, 1972.
2. Centers for Disease Control and Prevention. Maternal mortality: United States, 1982-1996. MMWR Morb Mortal Wkly Rep 1998; 47: 705-707.
3. Pridjian G, Puschett JB. Preeclampsia: Part 2-Experimental and genetic considerations. Obstet Gynecol Surv 2002; 57: 619-640.
4. Pridjian G, Puschett JB. Preeclampsia: Part 1-Clinical and pathophysiologic considerations. Obstet Gynecol Surv 2002; 57: 598-618. Seidl DC, Hughes HC, Bertolet R et al. True pregnancy toxemia (preeclampsia) in the guinea pig (*Cavia porcellus*). Lab Animal Sci 1979;29:472-478.
5. National High Blood Pressure Education Program: Working Group Report on High Blood Pressure in Pregnancy. Am J Obstet Gynecol 2000. 183:51.
6. Roberts JM., Cooper D.W. Pathogenesis and genetics of preeclampsia. Lancet 2001; 357: 53-6.
7. Kerr JF., Wylie AH. and Currie A.R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide ranging implications in tissue kinetics. British J of Cancer, 1972 ; 26 : 239-257.
8. Haanen C, Vermes I: Apoptosis: Programmed cell death in fetal development. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol 1996;64:129-133.

9. Stephen C. Smith, Philip N . Placental apoptosis in normal human pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 1997;177:57-65.
10. Gerdes J ed al. Ki-67 and other proliferation markers useful for immunohistological diagnostic and prognostic evaluations in human malignancies. *Semin Cancer Biol.* 1990 Jun;1(3):199-206
11. Urist MR. Bone: formation by autoinduction. *Science.* 150:893-899. 1965
12. Kaplan FS. and Shore EM. Encrypted morphogens of skeletogenesis: biological errors and pharmacologic potentials. *Biochem Pharmacol.* 55:373-382. 1998
13. Remmele W, Hildebrand U, Hienz HA, et al. Comparative histological, histochemical, immunohistochemical and biochemical studies on oestrogen receptors, lectin receptors, and Barr bodies in human breast cancer. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol* 1986;409:127-47.
14. Smith S.C., Baker P.N. and Symonds E.M. Placental apoptosis in normal human pregnancy. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 1997 ; 177 : 57-65.
15. Sayill J. Review: apoptosis in disease. *European Journal of Clinical Investigation*, 1994 ; 27 : 715-723.
16. Smith S.C., Leung, T.N., To, K.F. et al. Apoptosis is a rare event in first-trimester placental tissue. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 2000 ; 183 : 697-699.
17. Bulmer JN, Morrison L, Johnson PM. Expression of the proliferation markers Ki67 and transferrin receptor by human trophoblast populations. *J Reprod Immunol* 1988;14:291-302.
18. Gerard Nuovo. The utility of immunohistochemistry and in situ hybridization in placental pathology. *Arch Pathol Lab Med.* 2006;130: 979-983.

19. Cheung A, Ngann H, Chen W. The significance of proliferating cell nuclear antigen in human trophoblastic disease: an immuno-histochemical study. *Histopathology* 1993; 22: 565–8.
20. Udo Jeschke, Barbara Schiessl, Ioannis Mylonas. Expression of the proliferation marker Ki-67 and of p53 tumor protein in trophoblastic tissue of preeclamptic, HELLP, and intrauterine growth-restricted pregnancies. *International Journal of Gynecologic Pathology*. 25:354-360.
21. Ferrara, N and Davis-Smyth, T. The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocr.* 1997 ; Rev., 18: 4-25.
22. Alon, T., Hemo, I., Itin, A et al. Vascular endothelial growth factor acts as a survival factor for newly formed retinal vessels and has implications for retinopathy of prematurity. *Nature Med.*, 1995 ; 1 : 1024-1028.
23. Charnock-Jones DS, Sharkey AM, Rajput-Williams J, Burch D, Schofield JR, Fountain SA, Boock CA & Smith SK (1993) Identification and localization of alternately spliced mRNA's for vascular endothelial growth factor in human uterus and estrogen regulation in endometrial carcinoma cell lines. *Biol Reprod*, 1993 ; 48 : 1120–1128.
24. Sharkey AM, Charnock-Jones DS, Boock CA, Brown KD & Smith SK (1993) Expression of mRNA for vascular endothelial growth factor in human placenta. *J Reprod Fertil*, 1993 ; 99 : 609–615.
25. Carmeliet P, Ferreira V, Breier G, Pollefeyt S, Kieckens L, Gertsenstein M, Fahrig M, Vandenhoeck J, Kendraprasad H, Eberhardt C, Declercq C, Pawling J, Moons L, Collen D, Risau W, Nagy A. Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. *Nature* 1996; 380:435-439.

- 26.Lim, K., Zhou, Y., Janatpour, M.et al. Human cytotrophoblast differentiation/invasion is abnormal in preeclampsia. *Am. J. Pathol.*, 1997, 151:1809-1818.
- 27.Shore, V.H., Wang, T.H., Wang, C.L. et al. Vascular endothelial growth factor, placenta growth factor and their receptor in isolated human trophoblast. *Placenta*, 1997 ; 18 : 657-665.
- 28.Gerber, H.P., Condorelli, F., Park, J. and Ferrara, N. Differential transcriptional regulation of the two vascular endothelial growth receptor genes. Flt-1, but not Flk-1/KDR, is up-regulated by hypoxia. *J. Biol. Chem.*1997 ; 272 : 23659–23667
- 29.Ahmed, A., Li, X.F., Dunk, C. et al. Colocalization of vascular endothelial growth factor and its Flt-1 receptor in human placenta. *Growth Factors*, 1995 ; 12 : 235–243.
- 30.Satu Helske, Piia Vourela, Olli Carpen, et al. Expression of vascular endothelial growth factor receptors 1,2 and 3 in placentas from normal and complicated pregnancies. *Molecular Human Reproduction* 2001 ; Vol. 7, No 2 : 205-210.
- 31.EGBOR M. ; ANSARI T. MORRIS N. et al. Pre-eclampsia and fetal growth restriction : How morphometrically different is the placenta? *Placenta*, 2006 ; 27 : 727-734.

童綜合醫院檢體採集使用同意書

受檢者姓名：		病歷號碼：	
--------	--	-------	--

- 一、您（受檢者）在本院的就醫過程中，本院基於醫療目的，會採取您的檢體（血液、細胞、組織、器官、體液或其衍生物質），這些檢體採集的目的純粹是因為疾病治療之必要。
- 二、這份文件是為尋求您的同意，就上述的檢體經醫療目的使用後，若有剩餘，請同意本院用於發展醫學研究及創新醫療技術之用。若因研究產生學術文獻發表及實質效益時，本人同意捐贈給貴院做為疾病預防、診斷及治療等醫學研究或公益用途。
- 三、這些檢體的使用對您不會造成任何傷害，也不會洩漏任何與您相關的資訊，本院保證這些檢體使用後將會妥善處理。
- 四、不論您同意與否，絕不影響您在本院的就醫服務品質；您也可以隨時中止此項同意。
- 五、您不需任何理由，得拒絕您的檢體做為個人醫療使用外之醫學研究用途亦可拒絕非個人醫療使用外之檢體採集。

聲明

經醫師詳細說明後，我已經了解這份同意書的意思並同意本人（受檢者）之醫用剩餘檢體，供貴院作為上述之用。

此致

童綜合醫院

同意人：

（或法定代理人）

關係：病患之

說明醫師：

見證人：

中華民國 年 月 日

附註：一、立同意書人需由病患親自簽具；但病患如為未成年人或不能親自簽具者，得由醫療法第四十六條第一項規定之人員簽具。（民法規定：年滿 20 歲為成年人）

二、立同意書人非病患本人者，應填載與病患之關係。

三、立同意書人如有任何疑問或須更進一步瞭解，請於簽具本同意書前，詳細詢問相關醫師。